



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 528 313 A1**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑳ Anmeldenummer: **92113571.1**

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 37/02, A61K 47/10,  
A61K 47/18, A61K 47/14**

㉔ Anmeldetag: **10.08.92**

③① Priorität: **15.08.91 DE 4126983**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**24.02.93 Patentblatt 93/08**

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:  
**PT**

⑦① Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**W-6800 Mannheim 31(DE)**

⑦② Erfinder: **Woog, Heinrich, Dr.**  
**Lindenstrasse 6**  
**W-6947 Laudenbach(DE)**  
Erfinder: **Gruber, Werner**  
**Riedackerweg 2**  
**W-6943 Birkenau(DE)**  
Erfinder: **Markl, Hans Jörg**  
**Auf der Kreh 6**  
**W-6701 Ellerstadt(DE)**  
Erfinder: **Winter, Gerhard, Dr.**  
**Jahnstrasse 20E**  
**W-6915 Dossenheim(DE)**  
Erfinder: **Demmer, Fritz, Dr.**  
**Kastanienweg 21**  
**W-6945 Hirschberg/Leutershausen(DE)**

⑤④ Verfahren zur Herstellung von humanproteinhaltigen, konservierten Arzneimitteln für Infusions- oder Injektionszwecke.

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von humanproteinhaltigen, gut verträglichen konservierten Injektions- oder Infusionslösungen.

EP 0 528 313 A1

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von humanproteinhaltigen, konservierten Arzneimitteln zur Anwendung als Infusions- oder Injektionslösung in gut verträglicher Form.

Humanproteine im Sinne der vorliegenden Erfindung sind körpereigene, nur in geringen Mengen vorkommende Proteine, die für therapeutische Zwecke eingesetzt werden, wie z.B. t-PA (tissue plasminogen activator), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), Streptokinase, Urokinase, Interferon oder EPO (Erythropoietin), bzw. deren rekombinant hergestellten Derivate, die im wesentlichen ähnliche oder vergleichbare pharmakologische Eigenschaften besitzen.

In der Europäischen Patentanmeldung EP 0,430,200 werden humanproteinhaltige Arzneimittel zur subkutanen oder intramuskulären Applikation beschrieben, die durch Zusatz von Aminosäuren eine bessere Bioverfügbarkeit und eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu bekannten Darreichungsformen aufweisen.

Stabilisierte humanproteinhaltige Arzneimittel, die u.a. Harnstoff und verschiedene Aminosäuren enthalten, sind aus EP 0,306,824 bekannt, wobei dort als Humanproteine insbesondere EPO und G-CSF beispielhaft erwähnt sind.

Ferner werden in EP 0,456,153 galenische wäßrige Formulierungen von EPO zur Herstellung von Injektionspräparaten zur subkutanen oder intramuskulären Applikation beschrieben, die einen pH-Wert von 6 - 8 aufweisen und zur Stabilisierung ausschließlich ein Alkalimetallphosphat oder Alkalimetallhalogenid enthalten.

Die gentechnologische Herstellung der oben genannten Humanproteine ist beispielsweise aus den folgenden Patentanmeldungen bekannt: In den PCT-Anmeldungen WO 85/02610 und WO 86/03520 sind Verfahren zur gentechnologischen Erzeugung von rh-EPO (rekombinantes humanes Erythropoietin) beschrieben. Ferner ist die Herstellung von Polypeptiden mit erythropoietin-ähnlicher Wirkung beschrieben in EP 0,409,113; EP 0,357,804; WO 86/02100 und WO 91/05867. Aus dem Stand der Technik sind weiterhin Verfahren zur Herstellung von anderen rekombinanten Proteinen bekannt, beispielsweise von Polypeptiden mit plasminogenaktivator-ähnlicher Wirkung aus WO 90/09437; EP 0,227,462; EP 0,400,545 oder EP 0,440,763. Die Herstellung von Polypeptiden mit G-CSF ähnlicher Wirkung ist beispielsweise bekannt aus EP 91 107 429.2 oder PCT/EP 91/00192.

EPO ist ein Glycoprotein, welches die Bildung von Hämoglobin bzw. Erythrocyten im Knochenmark stimuliert. Dieses Lipoprotein wird hauptsächlich in der Niere gebildet, findet sich in sehr geringer Menge im Serum und wird unter physiologischen Bedingungen im Urin ausgeschieden.

Es wurde allerdings festgestellt, daß humanproteinhaltige Injektions- oder Infusionslösungen verschiedener Hersteller aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzungen in der galenischen Formulierung oder aufgrund geringer struktureller Unterschiede der Wirkstoffe hinsichtlich der Aminosäuresequenz oder des Glykosylierungsmusters des Proteins unterschiedlich verträglich waren. Obwohl die aus dem Stand der Technik bekannten Lösungen im wesentlichen isotonische Lösungen waren, die an sich ohne größere Probleme gut verträglich sein sollten, wurden bei der Applikation unangenehme Nebenwirkungen festgestellt. Bei der Verabreichung von beispielsweise EPO-haltigen Injektionslösungen hatten Patienten oft über Schmerzen an der Einstichstelle geklagt, die während und nach der Applikation auftraten. In Abhängigkeit von der jeweils verwendeten galenischen Formulierung traten bei vielen Patienten häufig brennende Schmerzen auf, wenn insbesondere solche Injektionslösungen verabreicht wurden, die zur Stabilisierung humanes Serumalbumin und Zitratpuffer als Zusatz enthielten. In einigen Fällen kam es bei den Patienten zu erhöhter Temperatur, hohem Blutdruck, Urtikaria, Rückenschmerzen, Nausea oder auch zum Schock.

Ferner hat sich gezeigt, daß Injektionslösungen mit einem relativ geringen Gehalt an Wirkstoff nicht hinreichend gut stabilisiert werden können. So waren beispielsweise Arzneimittelformulierungen, die als Humanprotein EPO in einer Menge von z. B. 500 - 20.000 U enthielten, nicht ausreichend stabil. Es konnte nachgewiesen werden, daß einige galenische Formulierungen die unerwünschte Bildung von Aggregaten oder Agglomeraten der Humanproteine, insbesondere bei längerer Lagerung begünstigen. Dadurch kann es bei der Anwendung derartiger Präparate zu immunologischen Problemen kommen.

Die bisher aus dem Stand der Technik bekannten Arzneimittelpräparate, die Humanproteine enthalten, sind Formulierungen, die in der Regel keine Konservierungsmittel enthalten, da sie im allgemeinen für eine Einmalgabe in Form einer sogenannten Einmaldosis-Formulierung bzw. Eindosenbehälter eingesetzt werden. Sogenannte Multi-Dose-Einheiten bzw. Mehrdosenbehälter sind dagegen für eine mehrfache Applikation in bliebigen Teilmengen des Wirkstoffes geeignet. Dadurch werden besondere Ansprüche an die Stabilität und die Haltbarkeit derartiger Darreichungsformen gestellt, insbesondere bezüglich der Keimfreiheit der Lösungen. Aus diesem Grund werden derartige Lösungen mit Konservierungsmitteln versehen, um das Keimwachstum in der zubereiteten, fertig applizierbaren Injektions- oder Infusionslösung zu verhindern.

Die Herstellung von konservierten, humanproteinhaltigen Arzneimittelpräparaten hat sich jedoch als schwierig erwiesen. Beim Einsatz von Konservierungsmitteln hat sich gezeigt, daß diese Stabilitätsprobleme

bei der längerer Lagerung der Arzneimittel verursachen. Es kommt dabei zur Inaktivierung der Humanproteine und zur Bildung von Agglomeraten, die für die beobachteten Unverträglichkeiten der Injektionslösungen ursächlich sein können. Die üblichen Verfahren zur Herstellung von konservierten Arzneimittelrezepturen für Infusions- oder Injektionszwecke lassen sich im Falle der Humanproteinwirkstoffe nicht anwenden, da bei den Sterilisationsbedingungen im Autoklaven bei 121° C für 20 min. die Wirkstoffe inaktiviert und in ihrer Struktur zerstört werden. Es ist auch bekannt, daß die üblichen, in der Pharmazie verwendeten Konservierungsmittel mit den Humanproteinwirkstoffen reagieren und diese dabei inaktiviert werden. Aus diesem Grund wurden bisher intravenöse (i.v.) oder subkutane (s.c.) Präparationen als Monodosis-Formulierungen unter aseptischen Bedingungen hergestellt, ohne daß hierbei ein Konservierungsmittel verwendet wurde.

Es stellte sich die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung von konservierten, humanproteinhaltigen Arzneimitteln zu Injektions- oder Infusionszwecken zu finden, mittels dessen Arzneimittel hergestellt werden können, die die oben genannten Nachteile nicht aufweisen. Diese so hergestellten Arzneimittel sollten reproduzierbar gut verträglich appliziert werden können, eine möglichst schmerzfreie Applikation gewährleisten und keimfrei sein. Außerdem sollten Multi-Dose-Darreichungsformen (Mehrfachdosenbehälter) zur Verfügung gestellt werden, die keimfrei sind und gut verträglich appliziert werden können.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß bei der Herstellung von humanproteinhaltigen Arzneimitteln zu Injektions- oder Infusionszwecke Konservierungsmittel in einer Konzentration von bis zu 2 % (Gew.% zu Vol.%; G/V), insbesondere von 0.01 - 1 % bzw. 0.1 - 0.3 %, zugesetzt werden und diese gegebenenfalls vor der Herstellung der lagerfähigen Arzneimittelformulierung wieder entfernt werden. Durch eine Auswahl von solchen Konservierungsmitteln, die eine sehr geringe Allergierate aufweisen, ist es ferner möglich, derartige Konservierungsmittel auch in der lagerfähigen Arzneimittelformulierung zu belassen, so daß ein selektives Entfernen nicht unbedingt erforderlich ist.

Die so hergestellten Arzneimittel sind konserviert, d. h. sie enthalten Konservierungsmittel oder es waren während ihrer Herstellung mindestens zeitweise ein Konservierungsmittel zugegen. Zum Konservieren sind alle Stoffe geeignet, die bakterizid wirken. Die verwendeten Konservierungsmittel hemmen das Wachstum der bei der Abfüllung in das Präparat gelangenden Keime oder tötet diese ab.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es besonders vorteilhaft, wenn solche Konservierungsmittel eingesetzt werden, die ohne weiteres in einem der letzten Verfahrensschritte zur Herstellung der lagerfähigen Arzneimittelformulierung entfernt werden können. Dies hat den Vorteil, daß die applizierbaren Arzneimittel dann frei von jeglichen die Verträglichkeit beeinflussenden Konservierungsmitteln sind. Zu den flüchtigen Konservierungsmitteln, die dabei besonders günstig sind, gehören Chloreton (Chlorbutanol, 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol), Benzylalkohol, p-Chlor-m-kresol oder Pyrokohlensäure-Dialkylester der allgemeinen Formel  $R-O-CO-O-CO-O-R$ , wobei R eine  $C_1-C_6$ -Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl oder tert.-Butyl darstellt.

Aber auch wenn das Konservierungsmittel mitappliziert wird, lassen sich die Auswirkungen auf die Verträglichkeit minimieren. Nachdem festgestellt worden war, daß die verschiedenen Konservierungsmittel bei gleicher konservierender Wirkung eine unterschiedliche Allergierate aufweisen, läßt sich die Verträglichkeit durch die richtige Auswahl des Mittels verbessern. Konservierungsmittel mit geringer Allergierate sind insbesondere Chlorbutanol, Benzylalkohol und Benzalkoniumchlorid. Benzalkoniumchlorid steht für ein Gemisch aus quartären Ammoniumverbindungen (Quats) von der Art der Alkylbenzyl-dimethylammoniumchloride der allgemeinen Formel  $[H_5C_6-CH_2-N^+(CH_3)_2R]Cl$ , wobei R ein Alkylrest  $C_8H_{17} - C_{18}H_{37}$  ist, beispielsweise Benzododeciniumchlorid oder Cetalkoniumchlorid (vgl. Kirk-Othmer 2: 633 f; 19: 562 f.).

Diese Konservierungsmittel haben ferner den Vorteil, daß sie die in der Lösung enthaltenen Humanproteine nicht inaktivieren. Die Verträglichkeit wird auch verbessert durch eine möglichst geringe Konzentration des Konservierungsmittels. Insbesondere sollte der Gehalt eines einzelnen Konservierungsmittels in der Arzneimittellösung einen Wert von 10 mg/ml nicht überschreiten. Bevorzugt werden bis zu 5 mg/ml eines Konservierungsmittels in der Arzneimittellösung eingesetzt.

Die erforderliche Konzentration läßt sich durch verschiedene Maßnahmen minimieren. Beispielsweise dadurch, daß man die Inaktivierung des Humanproteins durch das Konservierungsmittel möglichst verhindert. Dies hat den weiteren Vorteil, daß die Stabilität der Injektionslösung erhöht wird. Die Inaktivierung läßt sich dadurch hemmen, daß man das Konservierungsmittel im Hinblick auf eine geringe Reaktivität auswählt. Die Inaktivierung wird zusätzlich zurückgedrängt, wenn der Kontakt zwischen Humanprotein und Konservierungsmittel möglichst kurzzeitig ist. Die erforderliche Konzentration des Konservierungsmittels in der Lösung läßt sich auch vermindern, indem seine Absorption an Materialien, wie z. B. an Gummi, ausgeschlossen wird, mit denen die Lösung in Berührung kommt.

Für die Verträglichkeit spielt die Art der verwendeten Konservierungsmittel eine bedeutende Rolle. Alle Konservierungsmittel weisen eine mehr oder weniger große Allergierate auf. Um Keimfreiheit zu garantieren,

ist ihr Einsatz aber nicht immer zu vermeiden. Nach den der Anmeldung zugrunde liegenden Untersuchungen ist es möglich, die Konservierungsmittel so bei der Herstellung der Injektionslösungen einzusetzen, daß sowohl eine weitestgehende Keimfreiheit garantiert ist, als auch Nebenwirkungen der Konservierungsmittel fast vollständig ausgeschlossen werden.

5 In vielen Fällen kann trotz der Tatsache, daß die zugesetzten Konservierungsmittel mit den Humanproteinen mehr oder weniger reagieren und diese dabei inaktivieren, nicht vollständig auf den Zusatz von Konservierungsmittel verzichtet werden, weil Keime beispielsweise beim Abfüllen in die Lösung eindringen können, oder weil, wenn aus einem sterilen Lyophilisat in einem Multidose-Behältnis eine Injektionslösung

10 Unproblematisch ist der Konservierungsmittelzusatz bei der Herstellung des Präparats, wenn das Konservierungsmittel so ausgewählt wird, daß es bei der Lyophilisation verdampft oder wegsублимиert. Konservierungsmittel, die eine entsprechende Flüchtigkeit aufweisen, sind z. B. Chloreton, Benzylalkohol.

Eine Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man die Humanproteine mit den erforderlichen Hilfsstoffen in Wasser löst, die erforderlichen Mengen an Konservierungsmitteln (bis zu  
15 maximal 6 %) hinzugibt, und, falls nötig, auf die Temperatur erwärmt, die das betreffende Humanprotein von seiner Stabilität her verträgt, ohne daß es dabei inaktiviert wird. Man läßt das Konservierungsmittel längere Zeit einwirken, bis die Lösung im wesentlichen keimfrei ist, d. h. etwa bis zu vier Stunden, vorzugsweise 10 min. bis zu zwei Stunden. Danach wird die Wirkstofflösung in Flaschen gefüllt und lyophilisiert. Hierbei wird das Konservierungsmittel in der Regel während der Lyophilisation wegsублимиert  
20 oder verdampft. Die so erhaltenen Lyophilisate ergeben nach Rekonstitution mit den üblichen Lösungsmitteln eine sterile Lösung zu Infusions- oder Injektionszwecken.

Die gute Verträglichkeit der Humanprotein-Injektionslösung wird unter anderem auch durch die richtige Wahl des pH-Wertes, der Pufferkapazität, der Titrationsacidität und der in der Lösung enthaltenen Puffersubstanzen beeinflusst.

25 Der obere pH-Wert der Lösung darf nicht wesentlich über dem Neutralpunkt liegen (der pH-Wert des Blutes liegt zwischen 7,2 und 7,4), weil Humanproteine im alkalischen Bereich nicht beständig sind. Für die intravenöse Gabe weisen die Lösungen vorzugsweise einen pH-Wert von etwa 4,5 - 7,4 auf. Für die subkutane Gabe sind Lösungen mit einem pH-Wert von etwa 6 - 7,4 bevorzugt. Die intravenöse und die subkutane Applikation unterscheiden sich deshalb, weil durch das intravenöse Anfluten von Blut und die im  
30 Blut enthaltenen Puffer eine schnellere Angleichung an physiologische pH-Verhältnisse möglich ist, als dies subkutan erfolgen kann. Da sich die Geschwindigkeit der Angleichung bei subkutaner und intravenöser Applikation auch noch durch eine möglichst niedrige Pufferkapazität und eine möglichst niedrigere Titrationsacidität verbessern läßt, hängt der akzeptable Minimalwert des pH-Werts der Lösung auch noch von diesen Parametern ab. Die Pufferkapazität der fertig applizierbaren Lösung liegt hierbei im Bereich von 0 -  
35 10 mVal/l und die Titrationsacidität im Bereich von 0 - 20 mVal/l. Insbesondere sollte die Pufferkapazität der fertig applizierbaren Lösung nicht mehr als 6 mVal/l und die Titrationsacidität nicht mehr als 10 mVal/l betragen.

Die Pufferkapazität wird allgemein definiert als diejenige äquivalente Menge (Val) an Säure oder Lauge, die erforderlich ist, um den pH-Wert einer Lösung mit dem Volumen von einem Liter um eine pH-Einheit zu  
40 verändern. Falls einbasige Säuren oder Basen für die Titration verwendet werden, entspricht die Angabe Val/l der verwendeten Säure oder Base der molaren Menge Mol/l dieser Säure. Da im vorliegenden Fall die verwendeten Lösungen einen pH-Wert im sauren Bereich aufweisen, kann alternativ die Pufferkapazität auch als diejenige Menge einer beispielsweise 0,1 n NaOH-Lösung definiert werden, die benötigt wird, um den pH-Wert einer Lösung von einem Liter um eine pH-Einheit anzuheben. Die humanproteinhaltigen  
45 Arzneimittellösungen enthalten bei der Bestimmung der Pufferkapazität die üblichen pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoffe.

Die Bestimmung der Pufferkapazität der humanproteinhaltigen Arzneimitteln erfolgt ausgehend von den fertig applizierbaren Injektions- oder Infusionslösungen, die neben dem Wirkstoff die sonst in der pharmazeutischen Praxis üblichen Hilfs- oder Zusatzstoffen enthalten. In der Regel besitzen die Lösungen einen  
50 sauren pH-Wert zur Stabilisierung des Proteins. Durch Titration mit Basen wird die entsprechende Menge der Base bestimmt, die erforderlich ist, um den pH-Wert der Lösung um eine pH-Einheit zu erhöhen.

Bevorzugte Grenzen für die Pufferkapazität in der Infusions- oder Injektionslösung sind für die intravenöse Gabe bis zu 2,4 ml einer 0,1 n Natronlauge, bevorzugt bis zu 0,5 ml. Dies entspricht einer Menge an Lauge von 0,24 mMol bzw. 0,05 mMol. Für die subkutane Gabe werden bevorzugt bis zu 1 ml  
55 einer 0,1 n NaOH-Lösung, insbesondere bis zu 0,2 ml einer 0,1 n NaOH-Lösung verwendet. Dies entspricht einer Menge an Lauge von bis zu 0,1 mMol, bzw. bis zu 0,02 mMol.

Ferner hat sich gezeigt, daß es vorteilhaft ist, wenn die fertig applizierbaren Injektions- oder Infusionslösungen eine möglichst geringe Titrationsacidität von bis zu 5 mVal/l aufweisen.

Bevorzugte Grenzen für die Titrationsacidität der Infusions- oder Injektionslösungen sind für die intravenöse Applikation bis zu 10 ml, bevorzugt bis zu 5 ml, 3 ml oder 1 ml einer 0,1 n NaOH-Lösung. Dies entspricht einer Titrationsacidität von bis zu 1 mmol/l, bzw. bis zu 0,3 mmol/l oder 0,1 mmol/l. Für die subkutane Applikation werden bevorzugt bis zu 5 ml, insbesondere bis zu 2 ml oder bis zu 0,5 ml einer 0,1 n NaOH-Lösung verwendet. Die Titrationsacidität beträgt in diesem Fall bis zu 0,5 mmol/l, bzw. bis zu 0,2 mmol/l oder 0,05 mmol/l.

Die Titrationsacidität bzw. -basizität wird allgemein definiert als diejenige Menge an Lauge oder Säure, die erforderlich ist, um den pH-Wert einer Lösung mit dem Volumen von einem Liter auf den pH-Wert des Blutes (etwa 7,2 - 7,4) einzustellen. Im vorliegenden Fall kann die Titrationsacidität alternativ auch als diejenige Menge einer beispielsweise 0,1 n NaOH-Lösung definiert werden, die erforderlich ist, um den pH-Wert von einem Liter einer Lösung auf den des Blutes (etwa 7,3) anzuheben. Die Humanprotein-haltigen Arzneimittellösungen enthalten bei der Bestimmung der Pufferkapazität die üblichen pharmazeutischen Hilfs- oder Zusatzstoffe. Das Verfahren zur Bestimmung der Titrationsacidität erfolgt in analoger Weise wie die Bestimmung der Pufferkapazität, indem man von der fertig applizierbaren Injektions- oder Infusionslösung ausgeht und diejenige Menge an Base bestimmt, die erforderlich ist, um den pH-Wert von etwa 7 der Lösung einzustellen.

Der brauchbare pH-Bereich für eine weitgehend schmerzfrei applizierbare Infusions- oder Injektionslösung liegt in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Humanproteins im sauren oder neutralen Bereich. Die Infusions- oder Injektionslösungen besitzen einen pH-Wert im Bereich von etwa 2 - 7,4. Bevorzugt werden Lösungen verwendet mit einem pH-Wert von etwa 3,8 - 7,4, wobei als untere Grenze insbesondere die pH-Werte 4,5 - 6,0, bevorzugt 5,5 - 6,0 in Frage kommen. Als obere Grenze des pH-Bereiches werden vorzugsweise pH-Werte der Lösungen verwendet, die in der Nähe des pH-Wertes des Blutes liegen. Für intravenöse Applikationen werden bevorzugt Lösungen mit einem pH-Wert von 6 - 7,4, insbesondere 6,8 - 7,2 verwendet. Für subkutane Applikationen werden bevorzugt Lösungen mit einem pH-Wert von 6,5 - 7,2, insbesondere 7,0 - 7,2 verwendet.

Außer der natürlich vorkommenden Form der Humanproteine können auch geeignete Muteine verwendet werden. Unter dem Begriff "Muteine" werden in der Regel solche Humanproteine verstanden, deren Aminosäuresequenz sich durch mindestens eine Aminosäure von der natürlichen Sequenz unterscheidet. Diese Unterschiede können darin bestehen, daß eine oder mehrere, vorzugsweise 1-10 Aminosäuren in der natürlichen Sequenz durch andere Aminosäuren ausgetauscht sind, oder daß eine oder mehrere Aminosäuren an das N- oder C-terminale Ende hinzugefügt bzw. auch weggelassen werden. Man spricht dann von N- oder C-terminalen Verlängerungen bzw. N- oder C-terminalen Deletionen. Die zuvor genannten Möglichkeiten lassen sich gegebenenfalls auch miteinander kombinieren, d.h. das N-terminale Ende der natürlichen Sequenz kann beispielsweise unter gleichzeitiger Verkürzung des C-terminalen Endes verlängert werden, wobei gegebenenfalls gleichzeitig auch eine oder mehrere Aminosäuren durch andere Aminosäuren ausgetauscht werden können. Im Hinblick auf die jeweilige Indikationsrichtung sollten die so erhaltenen Fragmente im wesentlichen die gleichen grundlegenden therapeutische Eigenschaften und Wirkungen aufweisen wie die natürlichen Humanproteine.

Allgemein bezieht sich der Begriff "rekombinant" auf solche Humanproteine, die mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie hergestellt werden. Diese Verfahren umfassen die Klonierung des Gens, das für das jeweilige Humanprotein kodiert, die Insertion der entsprechenden cDNA oder genomischen DNA in einen geeigneten Vektor, wie z.B. in bakterielle Plasmide, und die Transformation dieser rekombinanten Plasmide in geeignete Wirtszellen. Das klonierte Gen wird dann in der Wirtszelle exprimiert und das entsprechende Humanprotein wird auf an sich bekannte Art und Weise isoliert.

Die flüssigen oder auch lyophilisierten Arzneimittel enthalten gegebenenfalls üblich pharmazeutische Hilfsstoffe, wie z.B. Stabilisierungsmittel oder organische hydrophile Polymere. Als Stabilisierungsmittel sind beispielsweise geeignet Oligosaccharide, wie z.B. Sucrose, Tetralose, Lactose, Dextrane mit einem Molekulargewicht von etwa 10,000 - 2,000,000. Organische hydrophile Polymere sind Makromoleküle mit einem Kohlenstoffgrundgerüst, das aus hydrophilen monomeren Einheiten mit gegebenenfalls polaren Seitengruppen aufgebaut ist, wie beispielsweise Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon.

Ferner enthalten die Arzneimittellösungen pharmazeutisch übliche Puffer, wie z.B. Alkaliphosphate (Natrium- oder Kaliumphosphat bzw. deren Hydrogen- oder Dihydrogensalze), Salze von organischen oder anorganischen Säuren oder Aminosäuren. Die Zusammensetzung der verschiedenen Puffersubstanzen in der Rezeptur wird so gewählt, daß eine möglichst geringe Pufferkapazität der fertig applizierbaren Injektions- oder Infusionslösung resultiert. Dies kann dadurch geschehen, indem man eine möglichst geringe Menge der Puffersubstanzen einsetzt, wobei insbesondere die Gesamtmenge des Puffers eine Konzentration in der Arzneimittellösung von 100 mmol/l nicht übersteigen sollte. Bevorzugt werden Puffersubstanzen in einer Konzentration von 10 - 100 mmol/l, insbesondere von 20 - 60 mmol/l eingesetzt.

Alternativ dazu ist es auch möglich, die einzelnen Puffersubstanzen so auszuwählen, daß sie sich in ihrer im wesentlichen im sauren oder basischen Pufferbereich liegenden Wirkung gegenseitig kompensieren. In diesem Fall kann die Gesamtmenge an Puffersubstanzen bis zu 200 mmol/l in der fertig applizierbaren Arzneiform betragen.

5 Die lyophilisierten Arzneimittel enthalten vorzugsweise zusätzlich einen Gerüstbildner, der beim Einfrieren der wässrigen Lösung eine kristalline Matrix ausbildet, die auch während des sich anschließenden Lyophilisierens und bei der längeren Lagerung des Lyophilisats unter verschiedenen äußeren Bedingungen in ihrer Struktur stabil bleibt. In diesem Sinne kommen als geeignete Gerüstbildner Mannitol oder Glycin in Frage.

10 Die so hergestellten Arzneimittel kommen vorzugsweise in Form von Lyophilisaten in den Handel. Sie können als Single-Dose Präparate verwendet werden, wobei eine bestimmte Menge des Humanproteins in einer Injektionsflasche, Ampulle oder Karpule vorliegt und das Lyophilisat durch Zugabe der entsprechenden Menge an Rekonstitutionslösung gelöst wird. Die Rekonstitutionslösung kann bereits die erforderlichen Menge an Lauge enthalten, die nötig ist, um den gewünschten pH-Wert der injektionstfertigen Lösung einzustellen. Daneben können die üblichen isotonischen Zusätze verwendet werden. Das Lyophilisat kann 15 andererseits auch die zur Einstellung des vorteilhaften pH-Bereiches erforderlichen Mengen an basischen Reagenzien bereits ganz oder teilweise enthalten, so daß die Rekonstitution im wesentlichen mit destilliertem Wasser für Injektionszwecke erfolgt. Ferner können sowohl das Lyophilisat als auch die Rekonstitutionslösung Mittel enthalten, die die Herstellung einer isotonischen Lösung gewährleisten.

20 Die rekonstituierte Lösung wird dann auf eine Injektionsspritze aufgezogen und kann direkt dem Patienten appliziert werden. Sogenannte Single-Dose Präparate enthalten beispielsweise rh-EPO in einer Menge von 500 - 20.000, bevorzugt 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 oder 15.000 U. Bei entsprechend größerem Einsatz des Humanproteins können auch Multi-Dose-Präparate hergestellt werden. In diesem Fall wird ein größeres Volumen (etwa 5 - 10 ml) als Rekonstitutionslösung verwendet, wobei diese Lösung dann für 25 mehrere Applikationen verwendbar ist. Die zu applizierende Menge des Humanproteins kann in diesem Fall individuell vom Arzt festgelegt werden, bzw. für mehrere Applikationen bei verschiedenen Patienten eingesetzt werden.

Die spezifische Aktivität des zur Herstellung der Injektions- oder Infusionslösungen eingesetzten EPO beträgt vorzugsweise etwa 160.000 IU pro Absorptionseinheit bei 280 nm (vgl. EP 0,209,539).

30 Humanproteinhaltige Injektionslösungen enthalten gelöst in Wasser außer dem Wirkstoff übliche Hilfsstoffe, zu denen neben den schon erwähnten Stabilisatoren, Puffer, Komplexbildner und Netzmittel gehören. Die Puffer werden in Konzentrationen von etwa 1 bis etwa 100 mMol/l eingesetzt. Brauchbare pH-Werte der Lösungen liegen zwischen etwa 4,5 und etwa 7,4 bei intravenöser bzw. zwischen etwa 6,0 und etwa 7,4 bei subkutaner Applikation. Die obere Grenze liegt im pH-Wertbereich des Blutes (7,2 bis 7,4). Höhere pH- 35 Werte sind zu vermeiden, weil die Humanproteine im alkalischen Bereich in der Regel nicht beständig sind.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen im einzelnen beschrieben. Als Wirkstoff wird stellvertretend für die Klasse der Humanproteine jeweils rh-EPO und G-CSF eingesetzt. In gleicher Weise können aber auch andere Humanproteine verwendet werden.

Zur Herstellung der bei der Erfindung einsetzbaren Injektionslösungen werden in einem sterilen, mit 40 Rührwerk versehenen V2A-Doppelmantelkessel die Hilfsstoffe in Wasser gelöst. Die wesentlichen Hilfsstoffe sind Puffer, Komplexbildner, Stabilisatoren und Netzmittel. Für die Einstellung des physiologisch optimalen Bereichs für die intravenöse und die subkutane Anwendung sind als Puffer insbesondere geeignet: Glykokoll, Natriumcitrat, primäres Kaliumphosphat, sekundäres Natriumphosphat, Carbonat und Salze der Aminosäure, außerdem die Natrium- und Kaliumsalze der Apfelsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Weinsäure 45 und Asparaginsäure und Kombinationen dieser Substanzen. Die Puffer werden in einer Konzentration von etwa 1 bis etwa 100 mMol/l Lösung eingesetzt. Der Wirkstoff wird zu der Lösung hinzugegeben und es wird zum Endvolumen aufgefüllt und durchgerührt. Die Ansatzlösung wird über einen Membranfilter mit 0,2µm Porenweite steriltfiltriert. Die dabei gewonnene Lösung wird zu 0,5 ml in Injektionsflaschen unter aseptischen Bedingungen abgefüllt und danach in einer Lyophilisationsanlage getrocknet.

50 Die oben beschriebenen Rezepturen sind auch als spritzfertige Lösungen stabil. Bei ihrer Herstellung wird die erhaltene Lösung nicht lyophilisiert, sondern nach der Steriltfiltration direkt in eine Ampulle oder Injektionsflasche mit einem Volumen von beispielsweise 1 ml pro Behältnis abgefüllt.

Zur Herstellung der pharmazeutischen Darreichungsformen, die die Humanproteine enthalten, werden die üblichen pharmazeutischen Hilfs- oder Zusatzstoffe verwendet. Ferner können Stabilisierungs- oder 55 Solubilisierungsmittel, wie z.B. die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin oder Ornithin, zugesetzt werden. Als Aminosäuren werden insbesondere Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutamin, Glutaminsäure, Aminoessigsäure, Phenylalanin, sowie weitere in den Patentanmeldungen EP 0 430 200 oder EP 0 306 824 genannte Aminosäuren eingesetzt, die zur Stabilisierung oder Solubilisierung des Proteins dienen und

darüberhinaus auch als Puffersubstanzen eingesetzt werden können. Die Darreichungsform kann als Lyophilisat oder auch als gebrauchsfertige Infusions- oder Injektionslösung in den Handel gebracht werden.

Beim Konservieren der erfindungsgemäßen Injektionslösungen ist zu unterscheiden, ob eine Rezeptur für Monodosis-Behältnisse oder eine solche für Multidosis-Behältnisse vorliegt.

- 5 Da die üblichen in der Pharmazie verwendeten Konservierungsmittel mit den Humanproteinen reagieren und diese inaktivieren, werden häufig Präparationen für intravenöse und subkutane Applikationen als Monodosis-Formulierungen unter aseptischen Bedingungen hergestellt, ohne daß hierbei ein Konservierungsmittel verwendet wird. Nicht immer ist aber zu vermeiden, daß bei der Abfüllung einige Keime in das Präparat gelangen, die Schaden anrichten können, wenn sie in ihrem Wachstum nicht durch Zusatz eines
- 10 Konservierungsmittels gehemmt oder abgetötet werden. Um zu verhindern, daß das Konservierungsmittel das Humanprotein inaktiviert bzw. bei der Applikation eine Allergie hervorruft, wird gemäß der Erfindung bei Monodosis-Formulierungen ein Konservierungsmittel verwendet, welches beim Lyophilisieren der Lösung vor der Lagerung der Rezeptur eliminiert, d. h. verdampft oder sublimiert wird. Solche Konservierungsmittel sind z. B. Chloreton, Benzylalkohol, p-Chlor-m-Kresol und Pyrokohlensäure-Diethylester, wobei das erstere
- 15 und das letztere bevorzugt eingesetzt werden. Die brauchbaren Konzentrationen liegen zwischen etwa 0,1 und etwa 2,0 bevorzugt zwischen etwa 0,1 und etwa 0,3 %. Die genaue Konzentration hängt von der Wirkstoffkonzentration ab und wird von Fall zu Fall nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bestimmt.

- Der Gesetzgeber schreibt vor, daß Rezepturen in Multidosis-Behältnissen für die intravenöse und die subkutane Applikation ausreichend konserviert sein müssen, d. h. daß auch noch am letzten Tag der angegebenen Haltbarkeitsdauer eine konservierende Wirkung in vollem Umfang vorhanden sein muß. Um
- 20 dieser Forderung zu entsprechen, muß die Humanprotein-Lösung in der Injektionsform Konservierungsmittel enthalten. Dies wirft Probleme auf, weil - s. o. - die Konservierungsstoffe mit den Humanproteinen reagieren und bei Patienten eine Sensibilisierung hervorrufen. Die Reaktion mit dem Wirkstoff führt zu einer Verringerung einerseits der Wirkstoffaktivität und andererseits der konservierenden Wirkung, die dadurch
- 25 noch weiter verringert wird, daß es zur Absorption von Konservierungsmitteln an Gummistopfen kommt.

Erfindungsgemäß wird diesen Schwierigkeiten dadurch begegnet, daß Konservierungsmittel eingesetzt werden, welche wenig mit Humanproteinen reagieren und wenig sensibilisierend wirken, daß ein möglichst kurzzeitiger Kontakt zwischen Humanprotein und Konservierungsmittel angestrebt wird und daß Faktoren ausgeschaltet werden, welche zum Verbrauch von Konservierungsmittel beitragen.

- 30 Zu den wenig reaktiven und sensibilisierenden Konservierungsmitteln zählen Chlorbutanol, Benzylalkohol, Benzalkoniumchlorid und Kombinationen dieser Stoffe. Beim Einsatz einzelner der genannten Konservierungsmittel werden folgende Konzentrationen angewandt: Chlorbutanol: 2,0-5,0mg/ml, bevorzugt: 3,0-4,0 mg/ml. Benzylalkohol: 1,0-5,0 mg/ml, bevorzugt: 2,0-3,0 mg/ml. Benzalkoniumchlorid: 0,01-0,05 mg/ml, bevorzugt: 0,02-0,03 mg/ml.

- 35 Es hat sich gezeigt, daß es besonders vorteilhaft ist, Kombinationen der einzelnen Konservierungsmittel einzusetzen. Dadurch wird ein besserer Konservierungseffekt erreicht und die nachteiligen Wechselwirkungen mit den Humanproteinen minimiert. Bei Einsatz eines einzigen Konservierungsmittels konnten in einigen Fällen in Abhängigkeit des verwendeten Humanproteins nicht die geforderte Stabilität der Präparate erzielt werden. Der Einsatz von Benzalkoniumchlorid in optimal konservierenden Konzentrationen
- 40 kann beispielsweise zur Inaktivierung des Humanproteins führen. Der Einsatz von Chlorbutanol in einer bei Kühlschranktemperatur noch nicht zur Aggregation des Humanproteins führenden Konzentration kann unter Umständen keine ausreichende Konservierung bewirken. Der Einsatz von Benzylalkohol in einer zur Konservierung ausreichenden Menge kann zu physikalischen Unverträglichkeiten und zu Trübungen der Arzneimittellösung führen. Durch Kombination der einzelnen Konservierungsmittel können diese Nachteile
- 45 vermieden werden. Bevorzugte Kombinationen sind Lösungen, die insbesondere Benzylalkohol/Benzalkoniumchlorid, Benzylalkohol/Chlorbutanol oder Chlorbutanol/Benzylalkohol/Benzalkoniumchlorid enthalten. Dabei wird Chlorbutanol vorzugsweise bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml, Benzylalkohol bis zu 10 mg/ml und Benzalkoniumchlorid bis zu 0.1 mg/ml, insbesondere von 0.01 - 0.05 mg/ml eingesetzt. Besonders vorteilhaft ist die kombinierte Verwen-
- 50 dung von Benzylalkohol und Benzalkoniumchlorid, wobei die Konzentration von Benzylalkohol in der Arzneimittellösung vorzugsweise 3 - 6 mg/ml und von Benzalkoniumchlorid 0.01 - 0.025 mg/ml beträgt.

Die Verwendung wenig reaktiver und wenig sensibilisierender Konservierungsmittel und der kurzzeitige Kontakt helfen bereits die erforderliche Konservierungsmittelmenge zu senken, weil dadurch der Abbau des Konservierungsmittels bei der Inaktivierung des Humanproteins minimiert wird.

- 55 Der möglichst kurzzeitige Kontakt wird sichergestellt, indem die Rezeptur in Lyophilisatform oder in konzentrierter Form - gegebenenfalls nachdem bei der Lyophilisation (s. o.) das Konservierungsmittel entfernt worden ist - steril gelagert und erst beim Ansatz der Injektionsform das Konservierungsmittel zugesetzt wird, wobei die Injektionslösung innerhalb von 30 Tagen verbraucht werden sollte.

Wird ein Lyophilisat gewählt, so kann die pharmazeutische Verpackungseinheit zusätzlich die zur Rekonstitution erforderlichen Lösungsmittel enthalten. Diese sind in der Regel so auf das entsprechende Lyophilisat abgestellt, daß bei der Mischung die spritzfertigen Lösungen mit den erfindungsgemäßen Eigenschaften erhalten werden. Das Lyophilisat kann die erforderlichen Mengen an Konservierungsmitteln bereits ganz oder teilweise enthalten, so daß die Rekonstitution im wesentlichen mit destilliertem Wasser für Injektionszwecke erfolgt. Andererseits ist es auch prinzipiell möglich, daß die Rekonstitutionslösung die erforderliche Menge an Konservierungsmitteln enthält, um die konservierten spritzfertigen Arzneimittellösungen zu erhalten. Im Fall der Multi-dose-Präparate ist dies die bevorzugte Variante.

Bei der Herstellung der pharmazeutischen Verpackungseinheit werden die Darreichungsformen in der Regel mit einem Beipackzettel versehen, auf dem unter anderem der Hinweis enthalten ist, daß die Infusions- oder Injektionslösungen eine gut verträgliche, schmerzfreie Applikation ermöglichen.

Anhand der folgenden Beispiele sollen erfindungsgemäße Humanprotein-Lösungen für Multidose-Behältnisse und ihre Herstellung noch genauer beschrieben werden. Bei den Lösungen handelt es sich um solche, die als Humanprotein EPO oder G-CSF enthalten. In gleicher Weise können aber auch andere Humanproteine eingesetzt werden. Die hergestellten Rezepturen liegen als Lyophilisate oder als flüssige Zubereitungen vor, die bei der Lagerung im Kühlschrank bei etwa +4° bis etwa +8° über Jahre stabil bleiben.

#### Beispiel 1: EPO 2.000 Units Injektionstrockensubstanz (Ansatz für 35.000 Flaschen)

In einem sterilen, mit Rührwerk versehenen 100 l V2A-Doppelmantelkessel werden die folgenden Hilfsstoffe gelöst:

|   |         |         |         |
|---|---------|---------|---------|
| Harnstoff                                     | 700,0 g | 70,0 g  | 0 g     |
| Natriumchlorid                                | 70,0 g  | 70,0 g  | 70,0 g  |
| Tween 20                                      | 7,0 g   | 7,0 g   | 7,0 g   |
| Chloreton                                     | 70,0 g  | 70,0 g  | 70,0 g  |
| Natriumdihydrogenphosphat x 1H <sub>2</sub> O | 38,4 g  | 38,4 g  | 38,4 g  |
| Dinatriumhydrogenphosphat x 2H <sub>2</sub> O | 350,0 g | 350,0 g | 350,0 g |
| Calciumchlorid x 2H <sub>2</sub> O            | 8,4 g   | 0,42 g  | -       |
| Glycin  | 105,0 g | 105,0 g | 105,0 g |
| L-Leucin                                      | 140,0 g | 140,0 g | 140,0 g |
| L-Isoleucin                                   | 140,0 g | 140,0 g | 140,0 g |
| L-Threonin                                    | 35,0 g  | 35,0 g  | 35,0 g  |
| L-Glutaminsäuren                              | 35,0 g  | 35,0 g  | 35,0 g  |
| L-Phenylalanin                                | 70,0 g  | 70,0 g  | 70,0 g  |
| Wasser f. Injektionszwecke ad                 | 70,0 l  | 70,0 l  | 70,0 l  |

Zu 30 l dieser Hilfsstofflösung werden 214,3 ml einer Erythropoietin-Rohstoffcharge mit einem EPO-Titer von 140.000 Units/ml gegeben und zum Endvolumen von 35 l aufgefüllt und durchgerührt. Mit der restlichen Hilfsstofflösung wird das Filtrationssystem gespült. Die Ansatzlösung wird über ein Membranfilter 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert. Die sterilfiltrierte Lösung wird zu 1 ml Injektionsflaschen unter aseptischen Bedingungen abgefüllt und in einer Lyophilisationsanlage gefriergetrocknet.

Die in dem Beispiel beschriebenen Rezepturen sind sowohl als Lyophilisate als auch als spritzfertige Lösungen lagerstabil.

#### Beispiel 2: EPO-Lyophilisat 1.000 Units (Ansatz für 35.000 Flaschen)

Bestandteile:

Erythropoietin 233,33 ml = 35 Mio Units



|    |   |           |           |           |
|----|---|-----------|-----------|-----------|
|    | Natriumchlorid                                | 100,0 g   | 100,0 g   | 100,0 g   |
|    | Tween 20                                      | 12,0 g    | 12,0 g    | 12,0 g    |
|    | Pyrokohlensäurediethylester                   | 210,0 g   | 210,0 g   | 210,0 g   |
| 5  | Natriumdihydrogenphosphat x 1H <sub>2</sub> O | 140,0 g   | 140,0 g   | 140,0 g   |
|    | Dinatriumhydrogenphosphat x 2H <sub>2</sub> O | 50,0 g    | 50,0 g    | 50,0 g    |
|    | Calciumchlorid x 2H <sub>2</sub> O            | 10,0 g    | 0,5 g     | - g       |
|    | Harnstoff                                     | 700,0 g   | 0,0 g     | 0,0 g     |
|    | Glycin  | 1.050,0 g | 1.050,0 g | 1.050,0 g |
| 10 | L-Leucin                                      | 92,0 g    | 92,0 g    | 92,0 g    |
|    | Glutaminsäure                                 | 103,0 g   | 103,0 g   | 103,0 g   |
|    | Phenylalanin                                  | 115,5 g   | 115,5 g   | 115,5 g   |
|    | Wasser f. Injektionszwecke ad                 | 70,0 l    | 70,0 l    | 70,0 l    |

15 Die Hilfsstoffe werden in 70 l Wasser für Injektionszwecke gelöst und danach in 2 Portionen auf 35 l aufgeteilt. Die ersten 35 l werden mit der erforderlichen Menge EPO-Wirkstoff versetzt. Die zweiten 35 l werden zum Spülen des Filtrationssystems verwendet. Die Ansatzlösung wird über ein Membranfilter 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert. Die sterilfiltrierte Lösung wird zu 1 ml Injektionsflaschen unter aseptischen Bedingungen abgefüllt und unter den gleichen Kriterien lyophilisiert wie im Beispiel 1 angegeben, wobei der

20 Pyrokohlensäure-Diethylester verdampft. Man erhält so ein weißes, poröses, in 2 ml Wasser gut lösliches Lyophilisat, das 3 Jahre im Kühlschrank oder 1 Jahr bei Raumtemperatur ohne großen Aktivitätsverlust gelagert werden kann.

Demselben Schema folgend lassen sich beispielsweise auch G-CSF und rPA-Lösungen herstellen, wobei jedoch die Auflösung der Lösungsbestandteile und die Sterilfiltration unter Stickstoffbegasung

25 durchgeführt wird.

#### Beispiel 3: EPO-Lyophilisat 5.000 U und 10.000 U

Bestandteile:

|    |   |               |                |
|----|---|---------------|----------------|
| 30 | Erythropoietin                                | 5.000 U       | 10.000 U       |
|    | Calciumchlorid x 2H <sub>2</sub> O            | 0,151 mg      | 0,302 mg       |
|    | Natriumchlorid                                | 2,500 mg      | 5,000 mg       |
| 35 | Polysorbat 20                                 | 0,250 mg      | 2,500 mg       |
|    | Natriumdihydrogenphosphat x 1H <sub>2</sub> O | 1,190 mg      | 2,380 mg       |
|    | Dinatriumhydrogenphosphat x 2H <sub>2</sub> O | 9,965 mg      | 19,930 mg      |
|    | Aminoessigsäure                               | 37,500 mg     | 75,000 mg      |
|    | L-Leucin                                      | 5,000 mg      | 10,000 mg      |
| 40 | L-Isoleucin                                   | 5,000 mg      | 10,000 mg      |
|    | L-Threonin                                    | 1,250 mg      | 2,500 mg       |
|    | L-Glutaminsäure                               | 1,250 mg      | 2,500 mg       |
|    | L-Phenylalanin                                | 2,500 mg      | 2,500 mg       |
| 45 | Wasser f. Injektionszwecke ad                 | 2,14 -5,35 ml | 4,18 -10,70 ml |

Die Herstellung der Lyophilisate erfolgt entsprechend der im Beispiel 1 gegebenen Vorschrift mit dem einzigen Unterschied, daß vor der Lyophilisation in 0,5 ml und nicht in 1 ml Flaschen abgefüllt wird.

Diese Lyophilisate werden mit Konservierungsstoffe enthaltenden, gut verträglichen Rekonstitutionslösungen vor der Anwendung gelöst: Chlorbutanol 5,0 mg, Wasser für Injektionszwecke ad 1,0 ml. Alternativ

50 können auch Lösungen von Benzylalkohol (etwa 4-5 mg/ml) unter Zusatz von Benzalkoniumchlorid (etwa 0,01- 0,05 mg/ml) verwendet werden.

Beispiel 4: EPO spritzfertige Injektionslösung

| Bestandteile:   | 1.000 U/ Ampulle | 2.000 U/ Ampulle | 5.000 U/ Ampulle | 10.000 U/ Ampulle |
|---|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| EPO   | 1.000 U          | 2.000 U          | 5.000 U          | 10.000 U          |
| Harnstoff   | 5.00 mg          | 5.00 mg          | 5.00 mg          | 5.00 mg           |
| Polysorbat 20   | 0,10 mg          | 0,10 mg          | 0,10 mg          | 0,10 mg           |
| NaCl  | 0,50 mg          | 0,60 mg          | 0,60 mg          | 0,60 mg           |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 0,31 mg          | 0,62 mg          | 0,62 mg          | 0,62 mg           |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 5,03 mg          | 10,06 mg         | 10,06 mg         | 10,06 mg          |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                 | 0,04 mg          | 0,08 mg          | 0,08 mg          | 0,08 mg           |
| Aminoessigsäure                                       | 7,50 mg          | 15,00 mg         | 15,00 mg         | 15,00 mg          |
| L-Glutaminsäure                                       | 0,25 mg          | 0,50 mg          | 0,50 mg          | 0,50 mg           |
| L-Isoleucin   | 1,00 mg          | 2,00 mg          | 2,00 mg          | 2,00 mg           |
| L-Leucin  | 1,00 mg          | 2,00 mg          | 2,00 mg          | 2,00 mg           |
| L-Phenylalanin  | 0,50 mg          | 1,00 mg          | 1,00 mg          | 1,00 mg           |
| L-Threonin  | 0,25 mg          | 0,50 mg          | 0,50 mg          | 0,50 mg           |
| Wasser f. Injektionszwecke                            | 1 ml             | 1 ml             | 1 ml             | 1 ml              |

Das Herstellungsverfahren unterscheidet sich von dem bei Beispiel 3 angewandten nur dadurch, daß man die erhaltene Lösung nicht lyophilisiert, sondern direkt in eine Ampulle oder eine Injektionsflasche zu je 0,5 ml pro Behälter abfüllt.

Diese Injektionslösungen werden vor der Anwendung mit 0,5 ml oder 1,0 ml einer konservierten, gut verträglichen Lösung mit folgender Zusammensetzung verdünnt: Benzylalkohol 5,0 mg; Wasser für Injektionszwecke ad 1,0 ml. Alternativ können auch Lösungen von Benzylalkohol (etwa 4-5 mg/ml) unter Zusatz von Benzalkoniumchlorid (etwa 0,01-0,05 mg/ml) verwendet werden.

Beispiel 5:Bildung von Oligomeren

rh-EPO enthaltende Arzneimittel wurden hinsichtlich ihrer Tendenz zur Ausbildung von Oligomeren untersucht. Die aus dem Stand der Technik bekannten Formulierungen wurden hierbei mit dem erfindungsgemäßen Formulierungen verglichen. Die Arzneimittel wurden als Lyophilisate bei verschiedenen Temperaturen über einen längeren Zeitraum gelagert und anschließend mit destilliertem Wasser rekonstituiert. Der prozentuale Anteil an Oligomeren in den Formulierungen wurde durch Western-Blotting bestimmt. Bei Formulierungen, die humanes Serumalbumin und Zitrat enthielten, wurden je nach Hersteller Aggregate mit einem Anteil von 16 %, 8 % bzw. 3 % gefunden, während die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Lösungen praktisch aggregatfrei waren.

Beispiel 6: rhG-CSF Lösungen mit pH 2,5

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| rhG-CSF                     | 0.175 mg     |
| Natriumchlorid              | 1.500 mg     |
| Polysorbat 80               | 0.050 mg     |
| Aminoessigsäure z.A.        | 5.750 mg     |
| L-Leucin                    | 0.500 mg     |
| L-Isoleucin                 | 0.500 mg     |
| L-Threonin                  | 0.125 mg     |
| L-Glutaminsäure             | 0.125 mg     |
| L-Phenylalanin              | 0.250 mg     |
| HCl 0,1 molar               | 0.000 mg     |
| Wasser für Injektionszwecke | + 493.025 mg |

pH-Wert der in 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke rekonstituierten Lösung: 2,5

## EP 0 528 313 A1

Diese Injektionslösungen werden vor der Anwendung mit 0,5 ml oder 1,0 ml einer konservierten, gut verträglichen Lösung mit folgender Zusammensetzung verdünnt: Benzylalkohol 5,0 mg; Wasser für Injektionszwecke ad 1,0 ml. Alternativ können auch Lösungen von Benzylalkohol (etwa 4-5 mg/ml) unter Zusatz von Benzalkoniumchlorid (etwa 0,01-0,05 mg/ml) verwendet werden.

5

### Beispiel 7

G-CSF-Rezepturen mit pH-Wert 4,5

10

15

20

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| rhG-CSF                     | 0,175 mg     |
| Natriumchlorid              | 1,500 mg     |
| Polysorbat 80               | 0,050 mg     |
| Aminoessigsäure z.A.        | 6,550 mg     |
| L-Leucin                    | 0,500 mg     |
| L-Isoleucin                 | 0,500 mg     |
| L-Threonin                  | 0,125 mg     |
| L-Glutaminsäure             | 0,125 mg     |
| L-Phenylalanin              | 0,250 mg     |
| NaOH 0,1 molar ad pH 4,5    | 0,000 mg     |
| Wasser für Injektionszwecke | + 492,225 mg |

pH-Wert der in 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke rekonstituierten Lösung: 4,5. Diese Injektionslösungen werden vor der Anwendung mit 0,5 ml oder 1,0 ml einer konservierten, gut verträglichen Lösung mit folgender Zusammensetzung verdünnt: Benzylalkohol 5,0 mg; Wasser für Injektionszwecke ad 1,0 ml. Alternativ können auch Lösungen von Benzylalkohol (etwa 4-5 mg/ml) unter Zusatz von Benzalkoniumchlorid (etwa 0,01- 0,05 mg/ml) verwendet werden.

Pufferkapazität : 3,0 mmol/l NaOH (30 ml 0,1 n NaOH)  
 30 Titrationsacidität : 5,0 mmol/l NaOH (50 ml 0,1 n NaOH)

### Beispiel 8

G-CSF-Rezeptur mit pH-Wert 3,8 - 4,0

35

40

45

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| rhG-CSF                       | 0,175 mg     |
| Natriumchlorid                | 1,500 mg     |
| Polysorbat 80                 | 0,050 mg     |
| Aminoessigsäure z.A.          | 5,750 mg     |
| L-Leucin                      | 0,500 mg     |
| L-Isoleucin                   | 0,500 mg     |
| L-Threonin                    | 0,125 mg     |
| L-Glutaminsäure               | 0,125 mg     |
| L-Phenylalanin                | 0,250 mg     |
| HCl 0,1 molar ad pH 3,8 - 4,0 | 0,000 mg     |
| Wasser für Injektionszwecke   | + 493,025 mg |

pH-Wert der in 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke rekonstituierten Lösung: 3,9. Diese Injektionslösungen werden vor der Anwendung mit 0,5 ml oder 1,0 ml einer konservierten, gut verträglichen Lösung mit folgender Zusammensetzung verdünnt: Benzylalkohol 5,0 mg; Wasser für Injektionszwecke ad 1,0 ml. Alternativ können auch Lösungen von Benzylalkohol (etwa 4-5 mg/ml) unter Zusatz von Benzalkoniumchlorid (etwa 0,01- 0,05 mg/ml) verwendet werden.

Pufferkapazität : 5,8 mmol/l NaOH (58 ml 0,1 n NaOH)  
 50 Titrationsacidität : 10 mmol/l NaOH (100 ml 0,1 n NaOH)

Beispiel 9

## G-CSF-Rezepturen mit pH 4

5

10

15

|   |           |                 |              |
|---|-----------|-----------------|--------------|
| rhG-CSF                                   | 0,175 mg  | 0,175 mg        | 0,175 mg     |
| Harnstoff                                 | 2,500 mg  | 0,250 mg        | 0,000 mg     |
| Natriumchlorid                            | 1,500 mg  | 1,500 mg        | 1,500 mg     |
| Polysorbat 80                             | 0,050 mg  | 0,050 mg        | 0,050 mg     |
| Aminoessigsäure z.A.                      | 3,750 mg  | 5,550 mg        | 5,750 mg     |
| L-Leucin                                  | 0,500 mg  | 0,500 mg        | 0,500 mg     |
| L-Isoleucin                               | 0,500 mg  | 0,500 mg        | 0,500 mg     |
| L-Threonin                                | 0,125 mg  | 0,125 mg        | 0,125 mg     |
| L-Glutaminsäure                           | 0,125 mg  | 0,125 mg        | 0,125 mg     |
| L-Phenylalanin                            | 0,250 mg  | 0,250 mg        | 0,250 mg     |
| Wasser für Injektionszwecke               | + 492.525 | mg + 492.975 mg | + 493.025 mg |
| pH-Wert der in 0,5 ml Wasser f.           | 4,0       | 4,0             | 4,0          |
| Injektionszwecke gelösten Lyophilisatform |           |                 |              |

20

Pufferkapazität : 5,8 mmol/l NaOH (58 ml 0,1 n NaOH)

Titrationsacidität : 10 mmol/l NaOH (100 ml 0,1 n NaOH)

Die in den Beispielen 1 - 9 beschriebenen Rezepturen sind sowohl als Lyophilisate als auch als  
spritzfertige Lösungen lagerstabil.

25

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von konservierten humanproteinhaltigen Arzneimitteln zur Anwendung als Injektions- oder Infusionslösung, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der Herstellung der Arzneimittel mindestens ein gegebenenfalls wieder entfernbares Konservierungsmittel in einer Konzentration von bis zu 2 % zusetzt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Konservierungsmittel ausgewählt wird aus der Gruppe Chlorbutanol, Benzylalkohol, Benzalkoniumchlorid oder Kombinationen dieser Stoffe.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Konservierungsmittel mit geringer Allergierate zugesetzt wird, das in der lagerfähigen Arzneimittelformulierung verbleibt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3 zur Herstellung von Multidose-Präparaten.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das im Verlauf der Herstellung der Arzneimittelformulierung zugesetzte Konservierungsmittel vor der Herstellung einer lagerfähigen Arzneimittelformulierung wieder entfernt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die entfernbaren Konservierungsmittel ausgewählt werden aus der Gruppe Chlorbutanol, Benzylalkohol, p-Chlor-m-Kresol, Pyrokohlensäure-Dialkylester oder Kombinationen dieser Stoffe.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Kontakt zwischen Konservierungsmittel und Humanprotein kurzzeitig erfolgt.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Humanproteine EPO oder G-CSF eingesetzt wird.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Konservierungsmittel in einer Konzentration von etwa 0,1 bis etwa 0,3 % eingesetzt wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der fertig applizierbaren Arzneimittelformulierung zwischen etwa 2,0 und etwa 7,4 liegt.
- 5 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferkapazität der Arzneimittelformulierungen auf einen Wert von bis zu 10 mVal/l eingestellt wird.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Titrationsacidität der fertig applizierbaren Arzneimittel auf einen Wert bis zu 15 mVal/l eingestellt wird.
- 10 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine gut verträgliche Puffersubstanz aus der Gruppe Glykokol, Natriumcitrat, Alkaliphosphate, Alkalicarbonat, Salze von Aminosäuren, Alkalisalze der Apfelsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Asparaginsäure oder Kombinationen dieser Substanzen zugesetzt wird.
- 15 14. Humanproteinhaltiges Arzneimittel für die intravenöse oder subkutane Applikation, dadurch gekennzeichnet, daß ein gut verträgliches Konservierungsmittel in einer Konzentration von 0,01 - 2 % enthalten ist.
- 20 15. Humanproteinhaltiges Arzneimittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Konservierungsmittel Chlorbutanol, Benzylalkohol, Benzalkoniumchlorid ist oder aus Kombinationen dieser Stoffe besteht.
16. Verwendung der nach den Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 13 hergestellten humanproteinhaltigen Arzneimitteln zur Herstellung von gut verträglichen Injektions- oder Infusionslösungen.

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 92 11 3571

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE   |   |   |   |
|--|---|---|---|
| Kategorie  | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile   | Betrifft Anspruch                               | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)          |
| X  | EP-A-0 058 903 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)   | 1-3, 5-7, 9, 10, 14-16                          | A61K37/02<br>A61K47/10<br>A61K47/18<br>A61K47/14  |
| Y  | * Seite 6, Zeile 23 - Seite 7, Zeile 2 *<br>* Seite 10; Beispiel 3 *<br>* Ansprüche *   | 4, 8, 11-13                                     |   |
| D, Y   | EP-A-0 306 824 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>* Seite 2, Zeile 1 - Zeile 3 *<br>* Seite 3, Zeile 4 - Zeile 8 *<br>* Seite 4; Beispiel 1 *<br>* Ansprüche *   | 4, 8, 11-13                                     |   |
| A  | GB-A-2 177 914 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)<br>* Seite 4; Beispiel 7 *<br>* Ansprüche 1, 2 *   | 1-16  |   |
| A  | ROTH H.J. ET AL 'Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis' 1971, SPRINGER VERLAG, BERLIN-HEIDELBERG-NEW YORK Band VIIa<br>* Seite 429 - Seite 432 *<br>* Seite 448 *<br>Band VIIb<br>* Seite 317 - Seite 321 * | 1-16  | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)<br><br>A61K |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt  |   |   |   |
| Recherchenort<br>DEN HAAG  |   | Abschlußdatum der Recherche<br>16 NOVEMBER 1992 | Prüfer<br>BOULOIS D.                              |
| <b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b><br>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : nichtschriftliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur<br>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument<br>* : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument |   |   |   |